

倍数性変動と細胞老化を起点とした肝発癌機構の解明

大阪大学微生物病研究所遺伝子生物学

松本 知訓

[I] 緒言

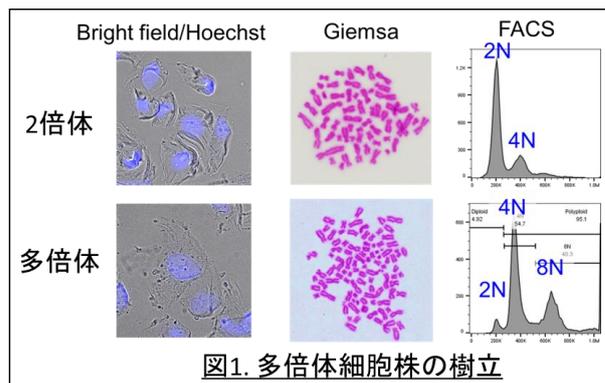
哺乳類の体細胞は原則として各染色体を2セットもつ2倍体であり、2倍体細胞は体細胞分裂(2極分裂)を行うことで同じく2倍体の娘細胞を生み出し増殖する。一方重要なことに、生体内には多数の染色体セットを持つ多倍体細胞(4n/8nなど)が様々な臓器に存在する。その代表例である筋細胞・巨核球・皮膚表皮細胞などにおいては、多倍体化は細胞の最終分化と分裂停止を惹起するとされており、さらに一部の細胞種では多倍体化は不可逆的な細胞周期の停止である細胞老化を誘導することも示されている。一方、DNA障害などにより生じる細胞老化はその過程で多倍体化を時に伴うことも知られており[Nat Cell Biol. 2006;8:1291-7, Mol Cell. 2014;55:73-84]、多倍体化は細胞老化プロセスの達成と細胞周期停止の維持に重要な細胞変化であることが推察されている。このように多倍体化と細胞老化には密接な関連があると考えられるが、多倍体化と細胞老化の細胞生物学的な関わりについては未だ不明な点が多い。

肝臓は代表的な多倍体臓器であり、その主要細胞である肝細胞の多くは多倍体化している。事実、成人ヒト肝臓では健常人では約30%程度の肝細胞が多倍体化しており、その割合は特に加齢や慢性肝障害により増加することが知られている。このような肝細胞多倍体化の意義は未だほとんど分かっていないが、我々は最近、多色レポーターマウスを用いて多倍体細胞の増殖と倍数性変化を可視化し追跡するモデルを構築し、多倍体肝細胞は豊富な増殖能を持ち慢性障害肝の再生を中心的に担うこと、再生過程で多倍体肝細胞は時に多極分裂を経て倍数性が減少した2倍体娘細胞を生み出し、この娘細胞も再生に寄与する、という肝細胞の特異な増殖・倍数性変化を示した[Cell Stem Cell. 2020;26:34-47]。またさらに、多倍体肝細胞は肝発癌の重要な起源ともなり、肝細胞の倍数性減少は染色体異常の惹起とがん抑制遺伝子の欠損を促進することで多倍体細胞を起源とする発癌の契機となることも明らかとなっている[Nat Commun. 2021;12:646]。

以上の結果は、肝細胞の多倍体化は必ずしも細胞増殖の停止や細胞老化につながらないことを示している。しかし一方で、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)などの慢性障害時には肝細胞の多倍体化と細胞老化が相関する様にも進行することも知られており[Hepatology. 2020;71:363-74]、肝障害中の肝細胞多倍体化と細胞老化には何らかの関連があることが示唆される。また興味深いことに倍数性減少は、細胞老化のエスケープと関わっている可能性も報告されている。抗癌剤治療時に癌細胞は細胞老化に至ることで死滅を免れるが、その際に生じた老化多倍体癌細胞は倍数性減少を来すと同時に細胞老化をエスケープし再増殖を始め、これが癌の薬剤耐性化の機序となっていることが提唱されている[Trends Cell Biol. 2018;28:465-74]。慢性障害肝で倍数性減少が生じるという我々の知見をふまえると、未だ非癌組織では証明されていない細胞老化エスケープが組織再生中に倍数性減少を基盤として生じ、これがゲノム障害を抱える多倍体老化肝細胞を起源とした発癌の原因となっている可能性も推察される。そこで本研究では、肝細胞の倍数性変化がDNA障害の蓄積と細胞老化の誘導に及ぼす意義を明らかにすることを目的に研究を行った。

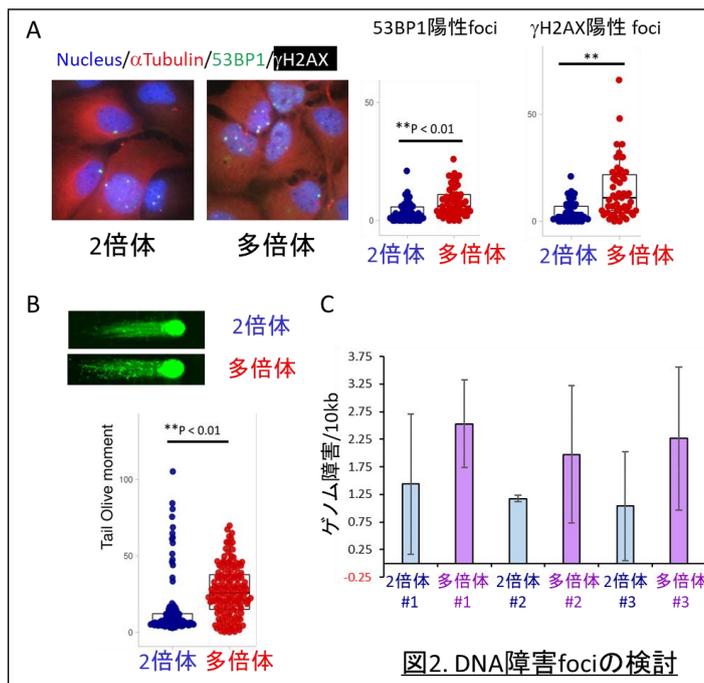
[II] 結果と考察

多倍体化が、細胞の DNA 障害蓄積および細胞周期進行に及ぼす影響を検討するため、ヒト肝癌細胞株 Huh7 細胞を起源とした 2 倍体細胞株と多倍体細胞株をそれぞれ 3 株ずつ樹立した。樹立した各細胞株がそれぞれ 2 倍体細胞あるいは多倍体細胞を主として構成されることは、フローサイトメトリー、およびギムザ染色による染色体のカウントにより確認した (図 1)。

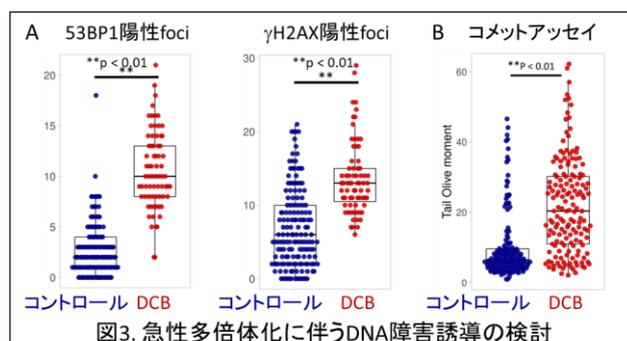


樹立した細胞株における DNA 障害の蓄積状況を、

γ H2AX および 53BP1 の蛍光免疫染色により評価した。免疫染色の結果検出された DNA 障害 foci は、2 倍体細胞株に比較して多倍体細胞株において有意に多く認められた (図 2A)。さらにコメットアッセイを用いて DNA 障害の蓄積を調べたところ、免疫染色で認められた DNA 障害 foci の数と同様に、多倍体細胞株で 2 倍体細胞株よりも多く DNA 障害が蓄積していた (図 2B)。リアルタイム PCR を用いたゲノム DNA 障害の定量比較 [Nucleic Acids Res. 2014;42:e41] でも、単離した複数の細胞株において一貫して、2 倍体細胞株に比べて多倍体細胞株が多くゲノム DNA 障害を抱えていることが示された (図 2C)。以上の結果より、特に細胞障害が加わらない状態においても多倍体細胞は 2 倍体細胞よりゲノム障害を多く持つことが明らかとなった。

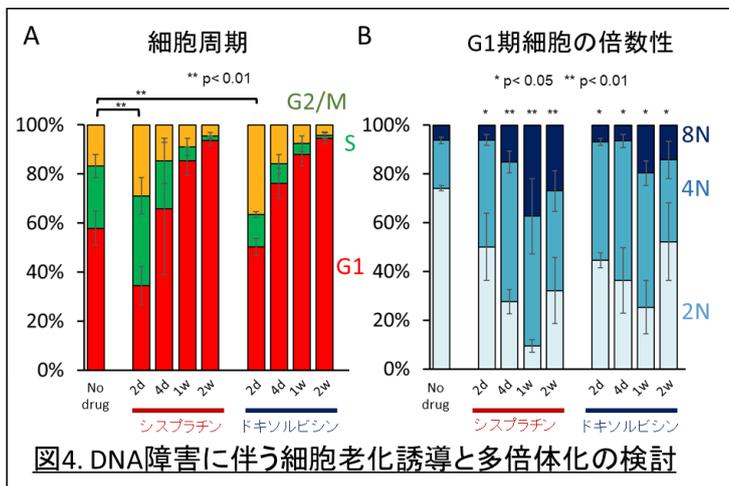


さらに多倍体化という細胞変化自体が DNA 障害を誘導するのかどうかを検討した。ヒト 2 倍体正常上皮細胞である RPE1 細胞にジヒドロサイトカラシン B (DCB) を添加し、細胞質分裂を阻害することにより急性多倍体化を誘導した。DCB 添加により多倍体化した直後の細胞は、53BP1 または γ H2AX 陽性の DNA 損傷 foci をコントロールより多く認められた (図 3A)。このような多倍体化した細胞における DNA 障害の蓄積はコメットアッセイでも確認され (図 3B)、多倍体化過程は DNA 障害を亢進させることが明らかとなった。

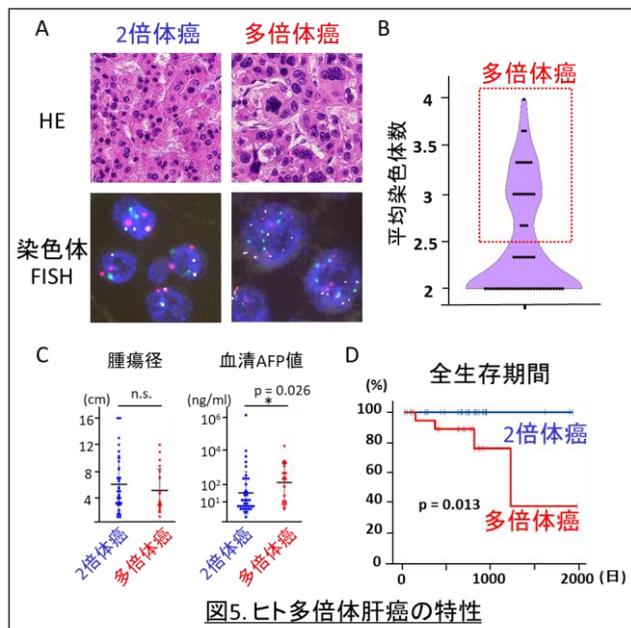


次に細胞障害により誘導される多倍体化の意義について検討した。まず細胞周期の動態を可視化することができる Fucci [BioRxiv 2020;DOI:10.1101/2020.03.30.015156] を発現する安定細胞株を樹立した。そして樹立した Huh7-Fucci 細胞をシスプラチンおよびドキシソルビシンで処理し DNA 障害を誘導した。薬剤処理を開始して 2 日、4 日、1 週間、2 週間後の細胞を回収し、各時点での細胞周期の状態をフローサイトメトリーで解析したところ、薬剤処理 2 日目の時点では一過性に S 期、G2/M 期の細胞割合の増加が認められ、その

後は経時的に G1 期で停止する細胞割合が増加していた(図 4A)。シスプラチン・ドキシソルビシンはいずれも S 期細胞の DNA 合成を阻害することから、一過性に S 期で細胞周期進行が遅滞した後、徐々に G1 arrest へと遷移したものと考えられた。さらにシスプラチン・ドキシソルビシン処理により G1 arrest に至った細胞は、薬剤を除去した後も再増殖を来さず巨大化した細胞として認められ、これら薬剤は DNA 障害を惹起することで細胞老化を誘導したものと考えられた。このような DNA 障害・細胞老化誘導中の細胞の倍数性変化をフローサイトメトリーを用いて検討したところ、シスプラチン・ドキシソルビシンいずれの細胞障害においても、過半数の細胞に多倍体化が誘導されていることが明らかとなった(図 4B)。しかしながら重要なことに、細胞老化に至った全ての細胞が多倍体化を伴っているわけではなく、2 倍体のままで細胞老化となった細胞も一定の割合で認められた。細胞老化誘導に伴う多倍体化は、正常 2 倍体細胞である RPE1 細胞でも認められ、DNA 障害による細胞老化誘導では多倍体化が高頻度に認められるものの、細胞老化過程に多倍体化は必須ではないことが明らかとなった。



最後にこのような、DNA 障害の蓄積と密接な関連のある多倍体化を経て発癌したヒト肝癌の特徴を探索した。ヒト肝癌手術検体のパラフィン包埋病理切片を用いて染色体に対する蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) を行うことにより、染色体倍加を評価した(図 5A)。複数の染色体において倍加を調べ、その平均コピー数を算出することにより、各癌のゲノム倍加を評価した(図 5B)。算出された平均コピー数の分布は 2 峰性の分布を示し、その分布からゲノム倍加が示唆される肝癌は全症例の約 4 割を占めていた(図 5B)。これは近年、癌ゲノム解析から示唆されていた、肝癌のゲノム倍加の頻度と一致する結果であった。次にゲノム倍加を伴う多倍体肝癌と 2 倍体肝癌の特徴を比較したところ、多倍体肝癌は 2 倍体肝癌と比べ、腫瘍サイズはほぼ同等であるにもかかわらず、有意に血清 AFP 値が高値で、組織学的に低分化型の悪性度の高い腫瘍を多く認めた(図 5C)。そして重要なことに、多倍体肝癌は 2 倍体肝癌に比べ有意に予後不良であった(図 5D)。



以上の検討の結果、多倍体であることや多倍体化することが DNA 障害の蓄積を促進すること、逆に外的要因による DNA の障害の過程ではしばしば多倍体化が伴われ、多倍体化と DNA 障害蓄積には密接な正の関連があることが明らかとなった。そして、そのような多倍体化を経て癌化したヒト肝癌は予後不良であることも明らかとなった。多倍体化は発癌を促進し癌の悪性度を高める重要なイベントと考えられ、細胞の多倍体化は悪性度の高い癌の発生を抑制する、良い治療線標的となると考えられる。